

多倍体罗汉果 PCR-RFLP 参数的优化与应用

韦荣昌^{1,2}, 李 锋², 黄夕洋^{2*}, 蒋水元², 蒋向军³, 戴 俊⁴, 李志刚¹

(1. 广西大学, 南宁 530004; 2. 广西壮族自治区 广西植物研究所, 广西 桂林 541006; 3. 桂林亦元生

现代生物技术有限公司, 广西 桂林 541004; 4. 广西师范大学 生命科学学院, 广西 桂林 541004)

摘 要: 以多倍体罗汉果 DNA 为材料, 采用 L16(4⁵) 正交组合试验和单因素梯度试验, 研究 Mg²⁺、dNTP、引物、Taq DNA 聚合酶、模板 DNA 浓度和退火温度、循环次数等对 PCR 扩增结果以及内切酶量、酶切时间对酶切反应的影响。结果表明, 多倍体罗汉果 RFLP 最优 PCR 反应体系和扩增参数为: 在 25 μ L 扩增反应体系中, 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, 引物 0.1 μ mol/L, Taq DNA 聚合酶 2.0 U, 模板 DNA 60 ng; 退火温度为 56 $^{\circ}$ C, 循环次数为 35 次。酶切反应体系: 内切酶 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L, 内切酶 5.0 U, PCR 产物 15 μ L, 超纯水补至 20 μ L; 酶切时间 2 h。

关键词: 多倍体罗汉果; PCR-RFLP; 酶切反应; 优化与应用

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2009)06-0889-05

Optimization and preliminary study on the PCR-RFLP parameter of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

WEI Rong-Chang^{1,2}, LI Feng², HUANG Xi-Yang^{2*}, JIANG Shui-Yuan²,
JIANG Xiang-Jun³, DAI Jun⁴, LI Zhi-Gang¹

(1. Guangxi University, Nanning 530004, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, China; 3. Guilin Sumylyfe Modern Bio-Tech INC., Guilin 541004, China; 4. Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: In this paper, the DNA of polyploidy *Siraitia grosvenorii* was regarded as the research object, several important factors including MgCl₂, dNTP, primer, Taq DNA polymerase, template DNA, annealing temperature, amplification and enzyme quantity, digestion reaction time were optimized by L16(4⁵) orthogonal design experiment and single factor experiment in order to investigate the effects on the results of PCR amplification and digestion reaction. The test results showed that a total volume of 25 μ L PCR reaction system contained 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L, general service primer 0.1 μ mol/L, Taq DNA polymerase 2.0 U, template DNA 60 ng, and annealing temperature was 56 $^{\circ}$ C, amplification for 35 cycles was optimizational PCR amplification reaction of RFLP of polyploidy *S. grosvenorii*. The total volume of 20 μ L digestion reaction system contained digestion enzyme 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L, digestion enzyme 5.0 U, PCR product 15 μ L, digestion reaction time 2 h.

Key words: polyploidy *Siraitia grosvenorii*; PCR-RFLP; digestion reaction; optimization and application

罗汉果 (*Siraitia grosvenorii*) 是单性、雌雄异株的葫芦科 (Cucurbitaceae) 罗汉果属多年生藤本植

物 (路安民等, 1984), 为我国所特有, 主要产于广西的永福、临桂、龙胜等地。罗汉果甜苷作为一种综合

收稿日期: 2009-06-18 修回日期: 2009-10-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI06A11-01); 广西科技攻关项目 (桂科攻 5-2-2); 桂林科技攻关项目 (20080103-1) [Supported by National Key Technology R & D Program (2006BAI06A11-01); Key Technologies Research and Development Program of Guangxi (5-2-2); Key Technologies Research and Development Program of Guilin (20080103-1)]

作者简介: 韦荣昌 (1983-), 男, 广西梧州人, 硕士研究生, 主要从事药用植物学和分子生物学研究。

* 通讯作者 (Author for correspondence, E-mail: xiyang0687@163.com)

性状最佳的天然甜味剂,广泛应用于食品、保健品、药品中,适合所有人群长期食用,是糖尿病人、肥胖者、高血压患者的理想糖替代品(李典鹏等,2000)。多倍体罗汉果具有形态上的巨大性,可大幅提高相应部位的产量,增强抗逆性,提高活性成分含量,其中三倍体罗汉果还具有无籽的特性,大大提高了整果利用率和甜苷提取收得率,对整个罗汉果产业具有里程碑的意义。

限制性片段长度多态性-聚合酶链式反应(restriction fragment length polymorphism-polymerase chain reaction, PCR-RFLP)是一种模拟体内 DNA 复制过程的体外酶促合成特异性核苷酸片段技术。PCR-RFLP 标记具有很高的分辨能力,又以共显性的方式遗传,其结果有很强的重复性和准确性,在密度遗传连锁图谱、指纹图谱的构建,群体遗传与系统演化等研究领域有着重要的应用价值(张婷,2007)。随着 DNA 标记技术的发展,PCR-RFLP 标记已经广泛应用于猕猴桃属(李健仔等,2003)、仲彬草属(张利等,2006)、黄芪亚族(丁士友等,1995)、黄精族(吴世安等,2000)等植物的系统学和分子水平遗传多样性研究。而 PCR-RFLP 在多倍体罗汉果方面的应用至今一片空白,因此,通过对多倍体罗汉果 PCR-RFLP 参数的优化与应用初探,可以为多倍体罗汉果的分子育种、群体遗传与系统演化、高密度遗传连锁图谱的构建和新品种选育等研究与综合利用提供一定的指导作用。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

多倍体罗汉果新鲜叶片采自广西桂林兴安县漠川乡的罗汉果种植基地。选取生长状况良好的植株,采集 10 片左右健康成熟叶片,用硅胶干燥保存,带回实验室中待用。

1.2 主要仪器

PCR 仪(美国 BIO-RAD 伯乐公司, Model: PTC-200);微型高速离心机;电泳槽;电泳仪;凝胶成像系统;微量移液器;均为国外进口。

1.3 主要试剂

脱氧核糖核苷酸(dNTPs)和引物(primer)购于上海生工生物工程技术有限公司;Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L)和限制性内切酶购于 MBI 公司;Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers 购于华美

生物工程公司。

1.4 试验方法

1.4.1 多倍体罗汉果总 DNA 的提取 采用改良的 CTAB(2 $\times$)法(Doyle,1987)提取多倍体罗汉果叶片的总 DNA。

1.4.2 PCR-RFLP 反应体系的优化 经初步试验筛选后选择叶绿体基因组通用引物 trnD-trnT(5'-ACCAATTGAACTACAATCCC-3', 5'-CTACCCTGAGTTAAAAGGG-3')为优化试验用的引物。采用五因素四水平的正交试验设计选择最佳试验条件。在 25 μ L 扩增反应体系中设计 Mg²⁺、dNTP、随机引物、Taq DNA 聚合酶和模板 DNA 浓度五因素四水平(表 1),正交试验方案采用 L16(4⁵)(杜荣骞,1999)正交表(表 2)。在 BAO-RAD 热循环仪上进行 PCR 扩增反应,基本反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,52 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,40 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后在凝胶成像系统上观察并照相。

表 1 多倍体罗汉果 PCR-RFLP 扩增反应体系五因素四水平表

Table 1 Five factors and four levels of PCR-RFLP amplification reaction system of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

因素 Factor	MgCl ₂ 浓度 (mmol/L) MgCl ₂ concentration	dNTP 浓度 (mmol/L) dNTP concentration	引物浓度 (μ mol/L) Primer concentration	Taq DNA (U)	DNA 浓度 (ng) DNA concentration
水平	1.0	0.10	0.10	0.5	20
Level	1.5	0.20	0.20	1.0	40
	2.0	0.30	0.40	1.5	60
	2.5	0.40	0.60	2.0	80

1.4.3 PCR-RFLP 反应程序的优化 进一步对 PCR-RFLP 扩增反应程序中的退火温度和循环次数进行单因素梯度优化筛选,并比较两者对扩增条带清晰度的影响。退火温度、循环次数分别设计 4 个水平:52 $^{\circ}$ C、54 $^{\circ}$ C、56 $^{\circ}$ C、58 $^{\circ}$ C 和 30 次、35 次、40 次、45 次。PCR 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后在凝胶成像系统仪上观察并照相。

1.4.4 酶切反应的优化 在 20 μ L 酶切体系中,PCR 产物 15 μ L,10 $\times$ Buffer 2 μ L,酶切温度 37 $^{\circ}$ C,限制性内切酶(Hind III)和酶切时间分别设计 3 个水平:5 U、7.5 U、10 U 和 2 h、4 h、6 h,在 BAO-RAD 热循环仪上保温运行。酶切产物经 1.5%琼

脂糖凝胶电泳,EB 染色后在凝胶成像系统仪上观察并照相。

表 2 多倍体罗汉果 PCR-RFLP 扩增反应体系的 L16(4⁵)正交试验方案

Table 2 L16(4⁵) orthogonal test designed for the system of PCR-RFLP amplification reaction of polyploid *Siraitia grosvenorii*

序号 No.	MgCl ₂ 浓度 (mmol/L) MgCl ₂ concentration	dNTP 浓度 (mmol/L) dNTP concentration	引物浓度 (μmol/L) Primer concentration	Taq DNA (U)	DNA 浓 度(ng) DNA concentration
1	1.0	0.10	0.1	0.5	20
2	1.0	0.20	0.2	1.0	40
3	1.0	0.30	0.4	1.5	60
4	1.0	0.40	0.6	2.0	80
5	1.5	0.10	0.2	1.5	80
6	1.5	0.20	0.1	2.0	60
7	1.5	0.30	0.6	0.5	40
8	1.5	0.40	0.4	1.0	20
9	2.0	0.10	0.4	2.0	40
10	2.0	0.20	0.6	1.5	20
11	2.0	0.30	0.1	1.0	80
12	2.0	0.40	0.2	0.5	60
13	2.5	0.10	0.6	1.0	60
14	2.5	0.20	0.4	0.5	80
15	2.5	0.30	0.2	2.0	20
16	2.5	0.40	0.1	1.5	40

2 结果与分析

2.1 CTAB 法提取总 DNA

利用 CTAB 法从多倍体罗汉果叶片材料中提取到了较高质量的总 DNA,PCR-RFLP 的结果也表明此法提取的总 DNA 可以满意地扩增出相应的片段。部分多倍体罗汉果的总 DNA 如图 1 所示。

2.2 PCR-RFLP 反应体系的优化结果

根据 L16(4⁵)正交试验方案,一共有 16 个组合试验,不同组合的 PCR 扩增结果存在一定的差异,结果依次如图 2 中 1-16 泳道所示。

Mg²⁺ 对 PCR 扩增的特异性和产量有显著的影响,1-4 泳道和 13-16 泳道因 Mg²⁺ 浓度过低或过高而没有扩增出条带或扩增量极少无法进行下一步的实验;另外,5 泳道和 9-12 泳道的扩增结果中存在模糊和拖尾现象而不如 6-8 泳道的扩增效果好,其中由于 7、8 泳道中 dNTP 浓度偏低或偏高以及引物量的过高而影响了 PCR 产物量,所以 6 泳道扩增条带最清晰、明显且扩增产物量较多。

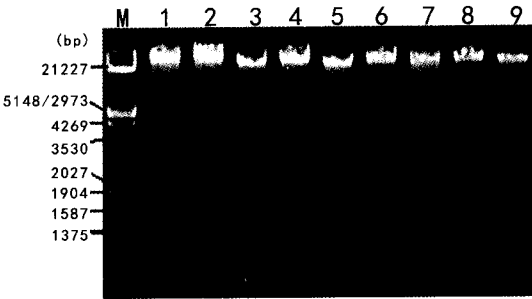


图 1 多倍体罗汉果的总 DNA
Fig. 1 Total DNA of polyploid *Siraitia grosvenorii*
M: Lambda DNA/HindIII + EcoRI Markers。下同。

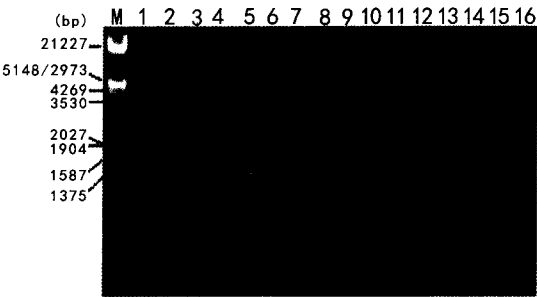


图 2 多倍体罗汉果 PCR-RFLP 正交试验方案优化结果
Fig. 2 The optimization results of orthogonal test designed for PCR-RFLP of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

因此,正交试验方案表明,多倍体罗汉果 PCR-RFLP 最优扩增反应体系为:在 25 μL 扩增反应体系中,10 × Buffer 2.5 μL, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 0.2 mmol/L,引物 0.1 μmol/L, Taq DNA 聚合酶 2.0 U,模板 DNA60 ng,此条件下扩增图谱条带清晰,信号较强,无背景干扰。

2.3 PCR-RFLP 反应程序的优化结果

2.3.1 退火温度单因素优化对 PCR-RFLP 反应程序的影响 退火温度是影响 PCR 产物多不多,条带亮不亮等特异性的较重要因素,退火温度与时间,取决于引物的长度、碱基组成及其浓度,还有靶基序列的长度,在 T_m 值允许范围内,选择较高的复性温度可大大减少引物和模板间的非特异性结合,提高 PCR 反应的特异性。

图 3 中 1-4 泳道依次分别代表优化 PCR-RFLP 扩增反应程序试验中设计的退火温度:52 ℃、54

℃、56℃、58℃。从试验结果可知:52~58℃均可扩增出条带,但52℃、58℃时扩增条带模糊且伴随轻度拖尾现象;而54℃、56℃时的扩增条带清晰,扩增产物量较多,为保证引物与模板的特异性结合,提高PCR反应的特异性,因此选择56℃为最优退火温度。

2.3.2 循环次数单因素优化对PCR-RFLP反应程序的影响 循环次数决定PCR扩增程度,循环次数主要取决于模板DNA的浓度。一般的循环次数选在30~40次之间,循环次数越多,非特异性产物的量亦随之增多。

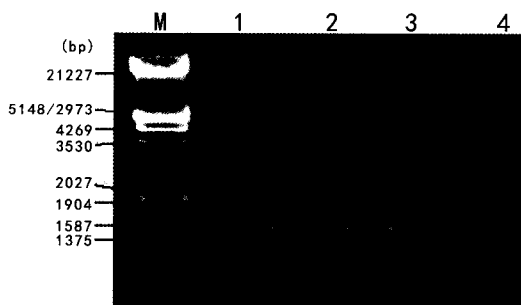


图3 多倍体罗汉果PCR-RFLP退火温度优化结果
Fig. 3 The optimization results of different annealing temperature of PCR-RFLP of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

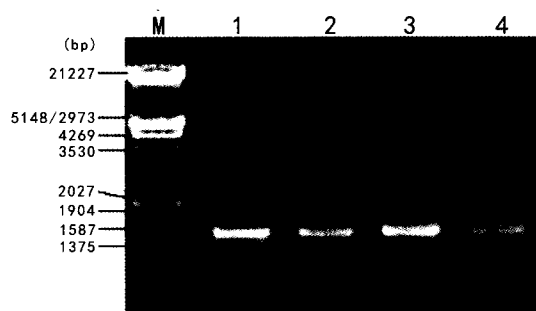


图4 多倍体罗汉果PCR-RFLP循环次数优化结果
Fig. 4 The optimization results of different cycles of PCR-RFLP of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

图4中1-4泳道依次分别代表优化PCR-RFLP扩增反应程序试验中设计的循环次数:30次、35次、40次、45次。从试验结果可知:30~45次循环均可扩增出条带,在40次、45次循环时,由于循环数过多,非特异性产物量增多并有一定的拖尾现象;30次、35次循环时,都能很好的扩增产物量,PCR产物都已达到检测水平,但30次循环时扩增产物量有分

散现象,故选择35次循环为最优循环次数。

因此,扩增反应程序的优化试验表明,罗汉果PCR-RFLP扩增的最优反应程序为:94℃预变性3 min;94℃变性1 min,56℃退火50 s,72℃延伸2 min,35个循环;72℃延伸7 min。

2.4 酶切反应的优化结果

通常,一个50 μL的反应体系中,1 μL的酶在1×NEBuffer终浓度及相应温度条件下反应1小时即可降解1 μg已纯化好的DNA。如果加入更多的酶,则可相应缩短反应时间;如果减少酶的用量,对许多酶来说,相应延长反应时间(不超过16 h)也可完全反应。

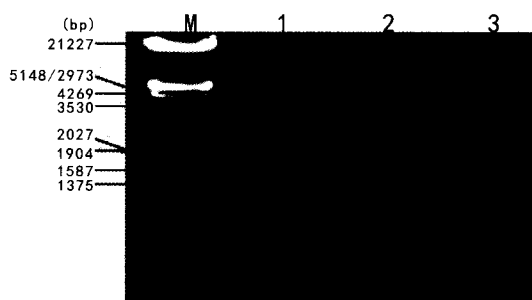


图5 多倍体罗汉果PCR-RFLP酶量优化结果
Fig. 5 The optimization results of enzyme quantity of PCR-RFLP of polyploidy *Siraitia grosvenorii*
M: Lambda DNA/Hind III + EcoR I Markers

图5和图6中的1、2、3泳道分别表示5 U、7.5 U、10 U和2 h、4 h、6 h。从试验结果可知:内切酶量5 U、7.5 U、10 U的扩增条带均为四条,且清晰度基本一致,无拖尾现象,出于经济效益考虑,5 U的内切酶量最优。酶切时间2 h、4 h、6 h的扩增条带也是四条,清晰、明亮度均基本一致,无背景干扰,出于节省时间考虑,2 h的酶切时间最优。

3 讨论

PCR反应主要因素有 Mg^{2+} 、dNTP、引物、酶和模板DNA。其中, Mg^{2+} 对PCR扩增的特异性和产量有显著的影响,在一般的PCR反应中 Mg^{2+} 浓度为1.5~2.0 mmol/L为宜, Mg^{2+} 浓度过高,反应特异性降低,出现非特异扩增,浓度过低会降低Taq DNA聚合酶的活性,使反应产物减少;在PCR反应中,dNTP应为50~200 μmol/L,尤其是注意4种dNTP的浓度要相等(等摩尔配制),如其中任何一

种浓度不同于其它几种时(偏高或偏低),就会引起

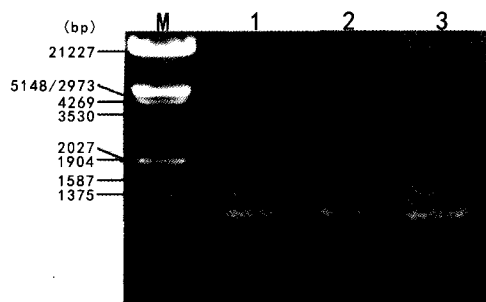


图 6 多倍体罗汉果 PCR-RFLP 酶切时间优化结果
Fig. 6 The optimization results of digestion reaction time of PCR-RFLP of polyploidy *Siraitia grosvenorii*

错配,浓度过低又会降低 PCR 产物的产量,dNTP 能与 Mg^{2+} 结合,使游离的 Mg^{2+} 浓度降低;引物与模板 DNA 互补的程度决定了 PCR 产物的特异性,通常以最低引物量产生所需要的结果为好,引物浓度偏高会引起错配和非特异性扩增,且可增加引物之间形成二聚体的机会;Taq DNA 聚合酶浓度过高可引起非特异性扩增,浓度过低则合成产物量减少;模板 DNA 的量一般在 20~200 ng 均可进行 PCR 扩增。本试验 PCR-RFLP 反应体系的优化是运用正交试验设计并严格遵循上述原则的基础上进行的,正交试验设计作为研究多因素多水平的一种设计方法,通过选择的所有水平组合即得正交表,表中的每个因素的每个水平与另一个因素各水平各碰一次是根据正交性从全面试验中挑选出部分有代表性的点进行试验,这些有代表性的点具备了“均匀分散,齐整可比”的特点,故正交试验设计是一种高效率、快速、经济的实验设计方法。试验结果准确,稳定性良好。此外,影响 PCR-RFLP 的一个重要因素就是污染,极其微量的污染即可造成假阳性的产生。在做 PCR 时,习惯把 dd H_2O 、10× Buffer 缓冲液、 Mg^{2+} 、dNTP、引物、模板 DNA、Taq DNA 聚合酶合到一个 Ep 管内混匀,再分装,这样可以减少操作,减免污染,增加准确性。值得注意的是:在 Ep 管开盖、吸样和污染进样枪的反复吸样以及加样时,因空气与液体面摩擦形成可随空气到处飘散的气溶胶而

污染,尤其是 10× Buffer 缓冲液最容易形成气溶胶,故在操作时,尽可能一步到位,避免反复吸取,同时开盖时要轻开轻盖;此外,酶应最后被加入到反应体系中(在加酶前所有其它试剂都应加好并预混和快速离心),且由于 Taq DNA 聚合酶和限制性内切酶的密度比其它试剂的密度大,故在加酶后一定要吹打混匀,可用枪轻轻地反复吸取或用手指轻弹 Ep 管底管壁,然后再快速离心即可。

参考文献:

- 杜荣骞. 1999. 生物统计学[M]. 北京:高等教育出版社,241—248
- Ding SY(丁士友), Gu HY(顾红雅), Qu LJ(瞿礼嘉), et al. 1995. A preliminary study on the use of RFLP analysis of the PCR amplified products in the systematic investigation of the subtribe astragal inae(fabaceae) (PCR 产物的 RFLP 分析在黄芪亚族(豆科)系统学研究中的应用初探)[J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 37(2):97—102
- Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. *Phytochem Bull*, 19:11—15
- Li DP(李典鹏), Zhang HR(张厚瑞). 2000. Studies and uses of Chinese medicine Luohanguo—a special local product of Guangxi (广西特产植物罗汉果的研究与应用)[J]. *Guihaia* (广西植物), 20(3):270—276
- Li JZ(李健仔), Li SG(李思光), Luo YP(罗玉萍), et al. 2003. PCR-RFLP analysis on chloroplast DNA of actinidia Ra(猕猴桃属植物叶绿体基因 PCR-RFLP 分析)[J]. *Bull Bot Res* (植物研究), 23(3):328—333
- Lu AM(路安民), Zhang ZY(张志耘). 1984. The genus siraitia merr. In China(中国罗汉果属植物)[J]. *Guihaia* (广西植物), 4(1):27—33
- Zhang L(张利), Zhou YH(周永红), Zheng YL(郑有良), et al. 2006. PCR-RFLP analysis of plasmon in *Kengyilia* populations (仲彬草属物种细胞质基因组 PCR-RFLP 分析)[J]. *Acta Prat Sin* (草业学报), 15(3):115—122
- Zhang T(张婷). 2007. Molecular marking technologies and their applications in conservation genetics(分子标记技术及其在保护遗传学中的应用)[J]. *J Wuhan Bioengineering Institute* (武汉生物工程学院学报), 3(2):109—110
- Wu SA(吴世安), Lv HL(吕海亮), Yang J(杨继), et al. 2000. Molecular systematic studies on the tribe Polygonateae(s. l.) in China based on RFLPs data of PCR-amplified chloroplast DNA fragments(叶绿体 DNA 片段的 RFLP 分析在黄精族系统学研究中的应用)[J]. *Acta Phytotaxon Sin* (植物分类学报), 38(2):97—110